

#2

PCT/JP 00/03000

4  
日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/3000

10.05.00	
REC'D 03 JUL 2000	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 5月10日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第127943号

出願人

Applicant(s):

東洋鋼板株式会社

高橋 浩二郎

株式会社日本パーカーライジング広島工場

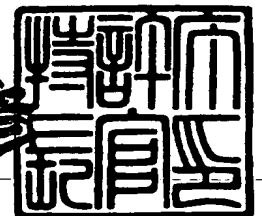
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3045012

【書類名】 特許願

【整理番号】 P1536

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12M 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 広島県広島市南区宇品御幸 1 丁目 9 番 2 6 号

    【氏名】 高橋 浩二郎

【発明者】

    【住所又は居所】 広島県広島市南区宇品東 2 丁目 2 番 2 9 号 株式会社日本パーカーライジング広島工場テクノセンター内

    【氏名】 高井 修

【発明者】

    【住所又は居所】 山口県下松市東豊井 1 2 6 番地の 1 東洋鋼鋳株式会社技術研究所内

    【氏名】 丹花 通文

【特許出願人】

    【識別番号】 390003193

    【氏名又は名称】 東洋鋼鋳株式会社

    【代表者】 田辺 博一

【特許出願人】

    【住所又は居所】 広島県広島市南区宇品御幸 1 丁目 9 番 2 6 号

    【氏名又は名称】 高橋 浩二郎

【特許出願人】

    【識別番号】 591091135

    【氏名又は名称】 株式会社日本パーカーライジング広島工場

    【代表者】 中山 進

【代理人】

    【識別番号】 100100103

    【弁理士】

【氏名又は名称】 太田 明男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017385

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708037

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNAライブラリーの作製方法、DNAライブラリーを固定化した基体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基体上のオリゴ (d T) n に mRNA をハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、相補的な DNA を固定化させる c DNA ライブラリー作製方法。

【請求項 2】 基体上に固定化した c DNA ライブラリーから mRNA を脱ハイブリダイズさせ、その mRNA を用いて、前記 c DNA ライブラリーと同一の c DNA ライブラリーを固定化させる c DNA ライブラリー作製方法。

【請求項 3】 制限酵素部位を有した基体上のオリゴヌクレオチドに、二本鎖の染色体 DNA ライブラリーをライゲーションさせた後、g DNA ライブラリーを固定化させる g DNA ライブラリー作製方法。

【請求項 4】 請求項 3 で作製した基体上の g DNA ライブラリーの固定化センス部分を用いて作製する一本鎖 g DNA ライブラリー作製方法。

【請求項 5】 請求項 3 で作製した g DNA ライブラリーのアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後、そのアンチセンス部分を用いて基体上にセンス部分を合成固定化させる一本鎖 g DNA ライブラリー作製方法。

【請求項 6】 前記基体が、あらかじめヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが化学修飾されたものである請求項 1 ～ 5 のいずれかの方法。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 のいずれかの方法によって作製された DNA ライブラリーを固定化した基体。

【請求項 8】 一本鎖の DNA ライブラリーが固定化された基体。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学、蛋白質工学、細胞工学、免疫学等の分子生物学や生化学関連分野において、微量の DNA 試料を用いて、DNA ライブラリー等を基体上に固定化したオリジナル・チップを作製する方法、その複製を作製する方法、

DNA断片を固定化した基体に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、DNAを用いてさまざまな実験をする場合は、DNAがきわめて貴重な試料であることから、PCR（ポリミラーゼ チェイン リアクション、Polymerase Chain Reaction）装置などを用いてこれを増幅し、小分けしていた。また、DNA試料の保管は極低温にて冷凍庫を用いていた。また、従来は、DNAライブラリーは溶液状態で作製されており、そのDNAライブラリーの複製（レプリカ）を作製することは不可能であった。従って、微量の組織や細胞から得られる溶液状態のDNAライブラリー試料を用いて行う遺伝子研究や遺伝子診断等はきわめて慎重に行わなければならなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、少量のDNAライブラリー試料を用いて、DNAライブラリーを基体（チップ）上に固定化したDNAライブラリー・チップ（オリジナル・チップ）を作製する方法を提供することを課題とする。

また、上記DNAライブラリー・チップを用いて、必要な数の複製（レプリカ）・チップを作製する方法を提供することを課題とする。

また、複製したDNA断片を固定化した基体を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

請求項1のcDNAライブラリー作製方法は、基体上のオリゴ（dT）<sub>n</sub>にmRNAをハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、相補的なDNAを固定化させることを特徴とする。

請求項2のcDNAライブラリー作製方法は、基体上に固定化したcDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせ、そのmRNAを用いて、前記cDNAライブラリーと同一のcDNAライブラリーを固定化させることを特徴とする。

請求項3のgDNAライブラリー作製方法は、制限酵素部位を有した基体上の

オリゴヌクレオチドに、二本鎖の染色体DNAライブラリーをライゲーションさせた後、gDNAライブラリーを固定化させることを特徴とする。

請求項4の一本鎖gDNAライブラリー作製方法は、請求項3で作製した基体上のgDNAライブラリーの固定化センス部分を用いて作製することを特徴とする。

請求項5の一本鎖gDNAライブラリー作製方法は、請求項3で作製したgDNAライブラリーのアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後、そのアンチセンス部分を用いて基体上にセンス部分を合成固定化させることを特徴とする。

請求項6の方法は、請求項1～5のいずれかの方法において、基体が、あらかじめヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドが化学修飾されたものであることを特徴とする。

請求項7の基体は、請求項1～6のいずれかの方法によって作製されたDNAライブラリーを固定化したものであることを特徴とする。

請求項8の基体は、一本鎖のDNAライブラリーが固定化されたものであることを特徴とする。

#### 【0005】

#### 【発明の実施の形態】

オリジナル・チップ又はレプリカ・チップを作製するには、ヌクレオチドあるいはオリゴヌクレオチドに対する化学修飾のみを施したオリジナル用チップ一枚と複製用のレプリカ用チップ複数枚とを用意する。そして、それらのチップをレプリカ作製装置に設置する。

#### 【0006】

本発明のDNAライブラリー・チップ作製装置を、図面を用いて説明する。

図1は、cDNAライブラリー・チップ作製装置の概略図である。図2は、gDNAライブラリー・チップ作製装置の概略図である。図3は、cDNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。図5は、gDNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。

#### 【0007】

図1に、cDNAライブラリー・チップの作製及び複製を自動的に行うことが

できる装置の概略を示す。

図1において、DNAライブラリー・チップ作製装置Aは、反応液等を容器に送液するための送液手段105と、反応液を切り替えて送液するための送液切替手段220と、試料注入注出用ノズル101を平面内の前後左右方向や上下方向等に駆動させることができるノズル駆動手段100と、チップの入った容器を保持するための容器保持手段10と、前記容器中の反応液を加熱冷却する容器液温度制御手段30と、固定化DNAライブラリー・チップの作製のための試料や試薬等の入った容器を保持するための試薬容器保持手段20と、前記試薬容器保持手段を所定温度に保持するための試薬容器温度制御手段40、などを備える。

容器保持手段10は、将来PCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮して、96本又はそれ以上の試料容器が挿入できるようにしたものであることが好ましい。

#### 【0008】

試薬容器保持手段20は、レプリカ作製では少なくとも4本の試料容器挿入穴が設けてあることが望ましい。

また、試薬容器保持手段20に設けられた容器挿入穴の数は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮すると、10本以上設けられていることが好ましい。

#### 【0009】

容器保持手段10や試料容器保持手段20は、例えばペルチェ素子等を用いた容器液温度制御手段30や試薬容器温度制御手段40で温度制御することを考慮して、熱伝導率の良いアルミ製ブロックであることが好ましい。

DNAライブラリー・チップを作製するためのチップ（基体）は、オリジナル・チップ及びレプリカ・チップとも、平板、球体、立方体、粒状などの形態のものであることが望ましい。

#### 【0010】

さらに、その材質を特に指定するものではないが、反応液などと反応しないものあるいはDNA固定化反応に対する阻害物質析出しないものが望ましい。例えばプラスチック、ガラス、シリコン、金属などを材料とし、その形状は板状、球

状、立方体状などである。特に好ましくは、ダイヤモンド、ダイヤモンドを含む炭素原子などから形成された基体である。

#### 【 0 0 1 1 】

(cDNAライブラリーのオリジナル・チップ、及びそのレプリカ・チップの作製)

図 1、図 3 を参照しながら、cDNAライブラリーを固定化させたオリジナル・チップ及びそのレプリカ・チップを作製する手順を説明する。

まず、オリゴ (dT)<sub>n</sub> (n は 15～30) を化学修飾した 3mm×3mm× 0.1 mmサイズのチップを作製したい枚数 (T 1～T n) だけ用意する。

これらのチップは、オリゴ (dT)<sub>n</sub> に対する化学修飾のみがされているチップ (化学修飾チップ) であって、いまだ DNAライブラリーは固定化されていないものである。

オリゴ (dT)<sub>n</sub> が化学修飾されたチップを用いる理由は、化学修飾されたチップ上には、容易に Total RNA の内の mRNA がハイブリダイズされるからである。

そして、これらのチップを容器 C B 1～C B n 内に挿入して、その容器を容器保持手段 1 0 に設置する。この場合、1 容器あたり 1 枚挿入するのが、少量の検体試料から得られる極微量の mRNA を用いて固定化 cDNAライブラリーのオリジナルチップ及びそのレプリカチップを確実に作製する、という観点から望ましい。

化学修飾チップを挿入した容器 C B 1～C B n を、容器保持手段 1 0 に設置する順序は、第 1 番目の挿入部 H T 1 にオリジナル・チップ用の化学修飾チップ T 1 の入った容器 C B 1 を置き、第 2 番目以降の挿入部 H T 2～H T n に必要枚数のレプリカ・チップ用の化学修飾チップ (T 2～T n) の入った容器 (C B 2～C B n) を順次整列して並べる。

#### 【 0 0 1 2 】

(オリジナル・チップの作製)

まず、所定温度 (例えば 4℃) に保持された試薬容器保持手段 2 0 に、精製された Total RNA 溶液 2 0 1 と逆転写酵素溶液 2 0 2 と、ヌクレオチド (dT, d



A, dG, dC) を含む反応液 2 0 3 等を設置する。また、DNA の洗浄・溶出用の TE 溶液 (トリズマベースと EDTA を含む緩衝液) 2 0 4、廃液槽 2 1 0 等を設置し、それぞれの溶液を液送するための溶液流路としてのキャピラリー管 2 3 0 を、送液切替手段 2 2 0 に接続する。キャピラリー管 2 3 0 は液体クロマトグラフィー用の耐腐食性のステンレス管等を用いることが望ましい。また送液手段 1 0 5 を通り試料注入注出用ノズル 1 0 1 を送液切替手段 2 2 0 との接続にはシリコンチューブ 2 3 1 を用いることが望ましい。

【0 0 1 3】

次に、試料注入注出用ノズル 1 0 1 を、容器保持手段 1 0 の HT 1 の位置に移動させ、1 番目のチップ (T 1) の入った容器 CB 1 の中にノズル 1 0 1 を挿入する。

【0 0 1 4】

送液切替手段 2 2 0 を反応液 2 0 3 側に設定し、送液手段である送液手段 1 0 5 を駆動して反応液を容器 CB 1 に注入する。送液切替手段 2 2 0 を Total RNA 溶液 2 0 1 に切替え、所定量を送液手段 1 0 5 で注入する。

【0 0 1 5】

所定温度 (例えば 2 0℃) 以下で一定時間 (例えば 2 0～3 0 分間) の静置の後に、送液切替手段 2 2 0 を逆転写酵素溶液 (酵素 1) 2 0 2 に切替え、所定量を送液手段 1 0 5 で注入する。

【0 0 1 6】

試料注入注出用ノズル 1 0 1 を容器 CB 1 から引き上げた後に、容器保持手段 1 0 の温度を所定温度 (例えば約 4 2℃) にし、一定時間 (例えば 3 0～6 0 分間) 静置し、mRNA から cDNA を作製させる逆転写酵素反応を進行する。

【0 0 1 7】

その後、容器保持手段 1 0 の温度を所定温度 (例えば 2 0℃) 以下にした後に、送液切替手段 2 2 0 を廃液槽 2 1 0 側に切替え、試料注入注出用ノズル 1 0 1 を容器 CB 1 に挿入し、送液手段 1 0 5 を駆動して容器 CB 1 内にある反応液を廃液層 2 1 0 に排出する。

【0 0 1 8】

送液切替手段 220 を TE 溶液 204 側に切替え、送液手段 105 を駆動して所定量の TE 溶液 204 を容器 CB1 内に注入し、その後送液切替手段 220 を廃液槽 210 側に切替え、容器 CB1 内の TE 溶液を廃液層 210 に排出する。上記の操作を数回（5 回以上が好ましい）繰返して、オリジナルの cDNA ライブラリー・チップの作製が完了する。この段階では、固定化 cDNA ライブラリー作製に利用された mRNA は、まだ DNA にハイブリダイズされた状態で保持されている。

#### 【0019】

次に、固定化 cDNA ライブラリーにハイブリダイズされている mRNA を脱ハイブリダイズさせ分離溶出するために、送液切替手段 220 を TE 溶液 204 側に切替え送液手段 105 を駆動して所定量の TE 溶液 204 を容器 CB1 に注入する。

#### 【0020】

溶液温度制御手段 30 を駆動させて容器保持手段 10 の温度を所定温度（例えば 90℃）にまで上昇させて、mRNA をハイブリダイズさせる。

#### 【0021】

その後、送液切替手段 220 を mRNA に対する一時保留容器 206 側に切替え、送液手段 105 を駆動して、脱ハイブリダイズされた mRNA 溶液をその一時保留容器 206 に移動させる。

#### 【0022】

（レプリカ・チップの作製）

次に、前記の方法によって作成されたオリジナルの cDNA ライブラリー・チップから脱ハイブリダイズされた mRNA を再利用して、そのレプリカ・チップを作製する方法を説明する。

#### 【0023】

まず、試料注入注出用ノズル 101 を容器 CB1 から引き上げた後に、そのノズル 101 を次のレプリカ用チップ（T2）の入った容器 CB2 に移動させ、送液手段 105 を逆方向に駆動させ一時保留した mRNA 溶液 206 を容器 CB2 に注入する。その後、上記したオリジナル・チップの作製方法で説明した工程を

繰り返す。ただし、後半のTotalRNA溶液201の注入工程は、一時保留したmRNAの注入工程と置き換わるため省略することができる。

すなわち、この容器CB2に、送液切替手段220を反応液203側に設定し、送液手段である送液手段105を駆動して反応液を容器CB2に注入する。

所定温度（例えば20℃）以下で一定時間（例えば20～30分間）の静置の後に、送液切替手段220を逆転写酵素溶液（酵素1）202側に切替え、所定量を送液手段105で注入する。

試料注入注出用ノズル101を容器CB2から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を所定温度（例えば約42℃）にし、一定時間（例えば30～60分間）静置する。

容器保持手段10の温度を室温（20℃）以下にした後に、送液切替手段220を廃液槽210側に切替え、試料注入注出用ノズル101を容器CB2に挿入し、送液手段105を駆動して容器CB2内にある反応液を廃液層210に排出する。

送液切替手段220をTE溶液204側に切替え、送液手段105を駆動して所定量のTE溶液204を容器CB2内に注入し、その後送液切替手段220を廃液槽210側に切替え、容器CB2内のTE溶液を廃液層210に排出する。上記の操作を数回（5回以上が好ましい）繰り返す。

このようにして、オリジナルのcDNAライブラリー・チップを複製した1枚目のレプリカ・チップが作製される。

#### 【0024】

上記のレプリカ・チップ作製のためのサイクリックな操作を必要回数繰り返して必要とする枚数のレプリカ・チップを作製する。

#### 【0025】

図2は、gDNAライブラリー・チップの作製と複製とを自動的に行うことができる装置の概略を示す。

図2のDNAライブラリー・チップ作製装置は、反応液等を容器に送液するための送液手段105と、反応液を切り替えて送液するための送液切替手段220と、試料注入注出用ノズル101を平面内の前後左右方向や上下方向等に駆動さ

せることができるノズル駆動手段100と、チップの入った容器を保持するための容器保持手段10と、前記容器中の反応液を加熱冷却する容器液温度制御手段30と、固定化DNAライブラリー・チップの作製のための試料や試薬等の入った容器を保持するための試薬容器保持手段20と、前記試薬容器保持手段を所定温度に保持するための試薬容器温度制御手段40、などを備える。

容器保持手段10は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置の接続等を考慮して、96本又はそれ以上の試料容器が挿入できるようにしたものであることが好ましい。

試薬容器保持手段20は、レプリカ作製では少なくとも4本の試料容器挿入穴が設けてあることが望ましい。

また、試薬容器保持手段20に設けられた容器挿入穴の数は、将来のPCR装置との接続やPCR産物解析装置との接続等を考慮すると、10本以上設けられていることが好ましい。

#### 【0026】

容器保持手段10や試料容器保持手段20は、例えばペルチェ素子等を用いた容器液温度制御手段30やで温度制御することを考慮して、熱伝導率の良いアルミ製が好ましい。

#### 【0027】

(gDNAライブラリーのオリジナル・チップ、及びそのレプリカ・チップの作製)

図2、図5を参照して、gDNAライブラリーを固定化させたオリジナル・チップ及びそのレプリカ・チップを作製する場合を説明する。

まず、制限酵素部位所有のオリゴヌクレオチド（センス部分）を化学修飾したチップ（その大きさは、例えば3mm×3mm×0.1mm）を作製したい枚数（T1～Tn）用意する。

オリジナル・チップ（T1）に対しては、そのオリゴヌクレオチド（アンチセンス部分）をハイブリダイズさせた後に、制限酵素処理を行い、完全な制限酵素部位を前もって作っておく。

#### 【0028】

オリジナル・チップT1を挿入した容器CB1と、制限酵素部位所有のオリゴヌクレオチド（センス部分）を化学修飾した化学修飾チップ（レプリカ用チップ）T2～Tnとを容器CB2～CBn内に挿入して、溶液保持手段10に設置する。

その設置順序は、第1番目の挿入部HT1にオリジナル・チップT1の入った容器CB1を置き、第2番目以降に必要な枚数のレプリカ用チップの入った容器CB2～CBnを順次整列して並べる。

#### 【0029】

所定温度（例えば4℃）に固定された試薬容器保持手段20に、精製された制限酵素処理済みgDNAライブラリー溶液306と、DNAリガーゼ（Ligase）溶液（酵素1）305と、DNAポリミラーゼ（Polymerase）溶液（酵素2）302と、ヌクレオチド（dT, dA, dG, dC）を含む反応液303等を設置する。また、DNAの洗浄・溶出用のTE溶液（トリズマベースとEDTAを含む緩衝液）304と、廃液槽310などを設置し、それぞれの溶液の溶液流路としてのキャピラリー管330を送液切替手段220に接続する。

そのキャピラリー管230は液体クロマトグラフィー用の耐腐食性ステンレス管を用いることが望ましい。また、キャピラリー管230の先には、送液手段105を介して、送液切替手段220、試料注入注出用ノズル101、などを接続する。その接続にはシリコンチューブ231を用いることが望ましい。

#### 【0030】

試料注入注出用ノズル101を、容器保持手段10のHT1の位置に移動させ、第1番目のチップ（T1）の入った容器CB1の中にノズル101を挿入する。

#### 【0031】

送液切替手段220を反応液303側に設定し、送液手段105を駆動して所定量（例えば17μL）の反応液303を容器CB1に注入する。送液切替手段220を、制限酵素処理されたgDNAライブラリー溶液306側に切替え、所定量（例えば2μL）を送液手段105で注入する。

#### 【0032】

所定温度（例えば20℃）以下で一定時間（例えば20～30分間）の静置の後に、送液切替手段220をDNAリガーゼ溶液（酵素1）305側に切替え、所定量（例えば1  $\mu$ L）を送液手段105で容器CB1内注入する。

#### 【0033】

試料注入注出用ノズル101を容器CB1から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を所定温度（例えば37℃）にし、一定時間（例えば30～60分間）の静置し、DNAリガーゼによる固定化されたgDNAライブラリーをチップT1上に作製する。

#### 【0034】

容器保持手段10の温度を所定温度（例えば20℃以下）にした後に、送液切替手段220を廃液槽310側に切替え、試料注入注出用ノズル101を容器CB1内に挿入し、送液手段105を駆動してCB1内の反応液を排出する。

#### 【0035】

送液切替手段220をTE溶液304側に切替え、送液手段105を駆動して所定量（例えば500  $\mu$ L）のTE溶液を容器CB1内に注入し、その後送液切替手段220を廃液槽310側に切替え、容器CB1内のTE溶液を排出する。この操作を数回（例えば5回以上）繰返して、固定化チップT1を洗浄する。

#### 【0036】

固定化チップT1の洗浄後、送液切替手段220を反応液303側に切替え、送液手段105を駆動して所定量（例えば19  $\mu$ L）の反応液を容器CB1内に注入する。

次に、容器保持手段10を所定温度（例えば90℃）に上昇させ、一定時間（例えば10～20分間）の静置によって、固定化gDNAライブラリー（センスとアンチセンスの2本鎖）からアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後に、送液切替手段220を、gDNAライブラリー（アンチセンス部分）を一時保留する容器306側に切替え、送液手段105を駆動させて、gDNAライブラリー（アンチセンス部分）溶液を容器CB1から注出する。

この段階で1枚目のgDNAライブラリー（センス部分）・チップ（オリジナル・チップ）が作製完了になる。

【0037】

(レプリカ・チップの作製)

試料注入注出用ノズル101を容器CB1から引き上げた後に、ノズル101を次のレプリカ用チップ(T2)の入った容器CB2に移動させ、一時保留したgDNAライブラリー(アンチセンス部分)溶液306をその容器CB2に注入する。

【0038】

上記のレプリカ・チップ作製のための上記のサイクリックな操作を必要回数繰り返して必要とする枚数のレプリカ・チップを作製する。

しかし、下記に説明する実施例2では、レプリカ作製段階で、DNAポリミラーゼ溶液(酵素2)302側に切替え、所定量(例えば1 $\mu$ L)を送液手段105で容器CB2内に注入する点に注意する。

【0039】

【実施例】

(実施例1)

図1、図3、図4を参照しながら、オリジナルの固定化cDNAライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの作製について説明する。

まず、試料の前処理として、①細胞・組織の破壊および②Total RNAの精製をすることによって試料の用意を行った(図3のS1)。

すなわち、固定化cDNAライブラリー・チップ作製のための試料の前処理段階として、約5mm角のラット肝臓組織を市販の試薬キットのISOGEN(株式会社ニッポンジーン製)中でホモジナイズし、以下そのプロトコールに従ってTotal RNAを精製した。

また、オリゴ(dT)<sub>n</sub>(nは15~30)の化学修飾のみをした3mm×3mm×0.1mmサイズのチップを10枚(T1~T10)用意した(図3のS2)。この固定化は、表面にアミノ基を付加したチップ(T1~T10)を、活性化した二価カルボン酸溶液で処理し、エタノール・蒸留水で順次洗浄した後、そのチップをオリゴ(dT)<sub>n</sub>水溶液中に入れて室温に10分間保持した。その後これらのチップ(T1~T10)を、1枚ずつそれぞれ別々の容器CB1~CB10内に、挿入

して、容器CB1～CB10を温度制御用器用アルミブロック10に設置した。

次に、4℃に固定された低温試料用アルミブロック20内に、精製された Total RNA溶液201と逆転写酵素溶液202、ヌクレオチド (dT, dA, dG, dC) を含む反応液203を設置した。また、低温試料用アルミブロック20外に、DNAの洗浄用のTE液 (トリズマベースとEDTAを含む緩衝液) 204、及び廃液槽210を設置した。そして、Total RNA溶液201、逆転写酵素溶液202、反応液203、TE液204、廃液槽210をキャピラリー管230で自動型八方切替バルブ220に接続した。

【0040】

試料注入注出用キャピラリー針101を、温度制御容器用アルミブロック10のHT1の位置に移動させ、1番目のチップT1 (オリジナルチップ) の入った容器CB1の中にキャピラリー針101を挿入した。

【0041】

自動型八方切替バルブ220を反応液203側に設定し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して17 $\mu$ Lの反応液を容器CB1に注入した。自動型八方切替バルブ220をTotal RNA溶液201に切替え、その2 $\mu$ Lをペリスタ型ポンプ105で注入し、チップ表面上に固定化されたオリゴ (dT) <sub>n</sub> とTotal RNA溶液中のmRNAとをハイブリダイズさせるために、20℃で20分間、静置した (図3のS3及び図4 (a) 参照)。

【0042】

静置後、自動型八方切替バルブ220を逆転写酵素溶液202側に切替え、逆転写酵素溶液202の1 $\mu$ Lをペリスタ型ポンプ105で注入した

【0043】

試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、容器保持手段10の温度を42℃にし、30min間の静置し、逆転写酵素によるチップT1上に固定化されたcDNAライブラリー (固定化チップ) を作製した (図3のS4及び図4 (b) 参照)。

【0044】

容器保持手段10の温度を再び20℃にした後に、自動型八方切替バルブ22



0を廃液槽210側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1に挿入し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して容器CB1内にある反応液を廃液槽210に排出した。

## 【0045】

自動型八方切替バルブ220をTE液204側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して500 $\mu$ LのTE液204を容器CB1内に注入し、その後自動型八方切替バルブ220を廃液槽210側に切替え、容器CB1内のTE液を廃液槽210に排出した。この操作を数回（5回以上）繰返して、固定化チップT1を洗浄した（図3のS5）。

## 【0046】

固定化チップT1の洗浄後、自動型八方切替バルブ220を反応液203側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動して19 $\mu$ Lの反応液203を容器CB1内に注入した。

次に、容器保持手段10の温度を90℃に上昇させ、10分間の静置によって、固定化cDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせた（図3のS6及び図4（d）参照）。

次に、自動型八方切替バルブ220をmRNAを一時保留する容器206側に切替え、ペリスタ型ポンプ105を駆動させて、脱ハイブリダイズしたmRNA溶液を容器CB1から分離注出し容器206に一時保留した（図3のS7）。

以上の工程によって、cDNAライブラリーを固定化した1枚目のcDNAライブラリー・チップ（オリジナル・チップ）を作製した（図3のS8及び図4（c）参照）。

## 【0047】

次に、試料注入注出用キャピラリー針101を容器CB1から引き上げた後に、キャピラリー針101を次のレプリカ用チップ（T2）の入った容器CB2に移動させた。レプリカ用チップ（T2）は、予め前述した化学修飾が施されているものを用いた。

## 【0048】

自動型八方切替バルブ220を一時保留容器206側に切替え、ペリスタ型ポ

ンプ 105 を駆動して、 $19\ \mu\text{L}$  の一時保留 mRNA 溶液を容器 CB 2 中に注入した（図 4 の（d）から（a）への矢印” R” 参照）。

【0049】

次に、固定化オリゴ（dT）<sub>n</sub> と mRNA とのハブリダイズのために、 $20^{\circ}\text{C}$  で 20 分間の静置の後に、自動型八方切替バルブ 220 を逆転写酵素溶液 202 側に切替え、逆転写酵素溶液 202 の  $1\ \mu\text{L}$  をペリスタ型ポンプ 105 で容器 CB 2 中に注入した（図 3 の S9）。

【0050】

試料注入注出用キャピラリー針 101 を容器 CB 2 から引き上げた後に、容器保持手段 10 の温度を  $42^{\circ}\text{C}$  にし、30 min 間の静置し、逆転写酵素によってチップ T2 上に固定化された cDNA ライブラリーを作製した（図 3 の S10 及び図 4（b）参照）。

【0051】

容器保持手段 10 の温度を再度  $20^{\circ}\text{C}$  にした後に、自動型八方切替バルブ 220 を廃液槽 210 側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針 101 を容器 CB 2 に挿入し、ペリスタ型ポンプ 105 を駆動して容器 CB 2 内にある反応液を廃液槽 210 に排出した。

【0052】

自動型八方切替バルブ 220 を TE 液 204 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 105 を駆動して  $500\ \mu\text{L}$  の TE 液 204 を容器 CB 2 内に注入し、その後自動型八方切替バルブ 220 を廃液槽 210 側に切替え、容器 CB 2 内の TE 液を排出した。この操作を 5 回繰返して、固定化チップ T2 を洗浄した（図 3 の S11）。

【0053】

固定化チップ T2 の洗浄後、自動型八方切替バルブ 220 を反応液 203 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 105 を駆動して  $19\ \mu\text{L}$  の反応液 203 を容器 CB 2 内に注入した。

【0054】

次に、容器保持手段 10 の温度を  $90^{\circ}\text{C}$  に上昇させ、10 分間の静置によって

、固定化 cDNA ライブラリーから mRNA を脱ハイブリダイズさせた（図 3 の S 1 2）。

次に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を mRNA を一時保留する容器 2 0 6 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動させて、脱ハイブリダイズした mRNA 溶液を容器 C B 2 から分離注出し（図 4（d）参照）、容器 2 0 6 に一時保留した（図 3 の S 1 3）。

以上の工程により、複製 cDNA ライブラリー・チップ（レプリカ・チップ）を作製した（図 3 の S 1 4 及び図 4（c）参照）。

【0 0 5 5】

チップ T 3 ～ T 1 0 の入った容器 C B 3 ～ C B 1 0 についても同様にして、上記操作 S 9 ～ S 1 4 を順次繰り返して、さらに 8 枚のレプリカ・チップを順次作製した。

【0 0 5 6】

ラット肝組織細胞の cDNA ライブラリーを固定化させたチップ（T 1 ～ T 1 0）を用いて、1 8 S rRNA に対する PCR 装置で遺伝子増幅を行い、電気泳動装置を用いて cDNA ライブラリーが固定化されていることを確認した。その結果、オリジナル・チップ T 1 及びレプリカ・チップ T 2 ～ T 1 0 とともに正常な cDNA ライブラリー・チップとして作製されていたことが確認できた。

【0 0 5 7】

（実施例 2）

図 2、図 5、図 6、図 7 を参照しながら、オリジナルの固定化 gDNA ライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの作製について説明する。

まず、試料の前処理として、①細胞・組織の破壊及び②染色体 DNA（gDNA）の精製・制限酵素処理をし試料の用意を行った（図 5 の S 2 1）。

また、チップ上に目的制限酵素部位の塩基配列をもったオリゴヌクレオチドのセンス部分を化学修飾したチップを 1 0 枚を用意した。大きさはおよそ 3mm×3mm×0.1 mm のものである（図 5 の S 2 2）。

このチップを概念的に表したものが図 6（d）の破線で囲まれた部分で示すチップ f である。その部分を拡大して示したものが図 7 である。

次に、上記の化学修飾したチップのうちの一個を用いて、そのオリゴヌクレオチドのアンチセンス部分をハイブリダイズさせた後に、制限酵素処理を行い、完全な制限酵素切断部位をもったチップ (T1) を一個作製した (図5のS23及び図6の(d) から (a) への矢印①参照)。

このチップを概念的に表したものが図6 (a) の破線で囲まれた部分で示すチップeである。その部分を拡大して示したものが図8である。

#### 【0058】

前記チップT1を挿入した容器CB1と、前記制限酵素部位を所有したオリゴヌクレオチドのセンス部分だけを化学修飾したチップ9枚 (T2~T10) をそれぞれ挿入した容器CB2~CB10とを、容器保持手段10に設置した。

#### 【0059】

次に、図2に示すように、4℃に固定された低温試料用アルミブロック20内に、精製された制限酵素処理済みgDNAライブラリー溶液306、DNA溶液 (酵素1) 305、DNAポリミラーゼ溶液 (酵素2) 302、ヌクレオチド (dT, dA, dG, dC) を含む反応液303に設置した。また、低温試料用アルミブロック20外に、DNAの洗浄・溶出用のTE液304、廃液槽310を設置した。

そして、図2に示すように、gDNAライブラリー溶液306、DNAリガーゼ溶液 (酵素1) 305、DNAポリミラーゼ溶液 (酵素2) 302、ヌクレオチド (dT, dA, dG, dC) を含む反応液303、DNAの洗浄・溶出用のTE液304、廃液槽310を、キャピラリー管230で自動型八方切替バルブ220に接続した。

#### 【0060】

試料注入注出用キャピラリー針101を、温度制御容器用アルミブロック10のHT1の位置に移動させ、1番目のチップT1 (オリジナル・チップ) の入った容器CB1の中にそのキャピラリー針101を挿入した。

#### 【0061】

自動型八方切替バルブ220を反応液303側に設定し、ペリスタ型ポンプ105を駆動して17μLの反応液303を容器CB1に注入した。自動型八方切

替バルブ 2 2 0 を 制限酵素処理された g DNA ライブラリー溶液 3 0 6 側に切替え、その 2  $\mu$  L をペリスタ型ポンプ 1 0 5 で注入した。

【 0 0 6 2 】

2 0  $^{\circ}$ C で 2 0 分間の静置の後に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を DNA リガーゼ溶液（酵素 1） 3 0 5 側に切替え、その 1  $\mu$  L をペリスタ型ポンプ 1 0 5 で容器 C B 1 内注入した。

【 0 0 6 3 】

試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 1 から引き上げた後に、容器保持手段 1 0 の温度を 3 7  $^{\circ}$ C にし、3 0 分間の静置し、DNA リガーゼによる固定化された g DNA ライブラリーをチップ（T 1）上に作製した。

（図 5 の S 2 5、及び図 6 の（a）から（b）へ移行する工程矢印②参照）。

【 0 0 6 4 】

容器保持手段 1 0 の温度を 2 0  $^{\circ}$ C にした後に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 3 1 0 側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 1 内に挿入し、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して C B 1 内の反応液を排出した。

【 0 0 6 5 】

自動型八方切替バルブ 2 2 0 を T E 液 3 0 4 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して 5 0 0  $\mu$  L の T E 液を容器 C B 1 内に注入し、その後自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 3 1 0 側に切替え、容器 C B 1 内の T E 液を排出した。この操作を 5 回以上繰返して、チップ（T 1）を洗浄した（図 5 の S 2 6）。

【 0 0 6 6 】

チップ（T 1）の洗浄後、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を反応液 3 0 3 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して 1 9  $\mu$  L の反応液を容器 C B 1 内に注入した。温度制御容器用アルミブロック 1 0 の温度を 9 0  $^{\circ}$ C に上昇させ、1 0 分間の静置によって、センスとアンチセンスの 2 本鎖からなる固定化 g DNA ライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた（図 5 の S 2 7、及び図 6 の（b）から（c）へ移行する工程矢印③参照）。そして、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を一時保留する容器 3 0 6 側に切替えて、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動させて、アンチセンス部分の g DNA ライブラリー溶液を容器 C B 1 から

注出した（図 5 の S 2 9、及び図 6 の（b）から（d）への移行矢印（液）参照）。

一方、チップ（T 1）上には、センス部分のみが固定化された、1 枚目の一本鎖 g DNA ライブラリー・チップ T 1（オリジナル・チップ）を作製した（図 5 の S 2 8 及び図 6 の（c））。

【0 0 6 7】

次に、試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 1 から引き上げた後に、キャピラリー針 1 0 1 を次のチップ（T 2）の入った容器 C B 2 に移動させ、2 0℃に保温した容器 C B 2 にヌクレオチドを含む反応液を加え、一時保留したアンチセンス部分のみの g DNA ライブラリー溶液 3 0 6 を容器 C B 2 内に注入し、2 0 分間保温した（図 5 の S 3 0）。

次に、DNA ポリミラーゼを添加して、3 7℃に温度を上げて 1 時間保温した。この結果、チップ（T 2）上に、センス部分が固定化された二本鎖の g DNA ライブラリーが作製された（図 5 の S 3 1 及び図 6 の（d）から（b）へ移行する工程矢印④参照）。

【0 0 6 8】

次に、上記二本鎖の g DNA ライブラリーが固定化されたチップ T 2 の挿入された容器 C B 2 を、2 0℃にした後に、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 3 1 0 側に切替え、試料注入注出用キャピラリー針 1 0 1 を容器 C B 2 内に挿入し、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して C B 2 内の反応液を排出した。

自動型八方切替バルブ 2 2 0 を T E 液 3 0 4 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して 5 0 0  $\mu$  L の T E 液を容器 C B 2 内に注入し、その後自動型八方切替バルブ 2 2 0 を廃液槽 3 1 0 側に切替え、容器 C B 2 内の T E 液を排出した。この操作を 5 回以上繰返して、チップ（T 2）を洗浄した（図 5 の S 3 2）。

チップ（T 2）の洗浄後、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を反応液 3 0 3 側に切替え、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動して 1 9  $\mu$  L の反応液を容器 C B 2 内に注入した。アルミブロック 1 0 の温度を 9 0℃に上昇させ、1 0 分間の静置によって、センスとアンチセンスの 2 本鎖からなる固定化 g DNA ライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた（図 5 の S 3 3、及び図 6 の（b）か

ら (c) へ移行する工程矢印⑤参照)。

そして、自動型八方切替バルブ 2 2 0 を一時保留する容器 3 0 6 側に切替えて、ペリスタ型ポンプ 1 0 5 を駆動させて、アンチセンス部分の g DNA ライブラリー溶液を容器 C B 2 から注出した (図 5 の S 3 5、及び図 6 の (b) から (d) へ移行する工程矢印 (液) 参照)。

チップ (T 2) 上にセンス部分のみが固定化された、2 枚目の複製品である 1 本鎖 g DNA ライブラリー・チップ T 2 (レプリカ・チップ) を作製した (図 5 の S 3 4、及び図 6 (c) 参照)。

以上のような繰り返しの操作を行うことによって、チップ上に 2 本鎖の g DNA ライブラリーを固定化し、その後 2 本鎖からなる固定化 g DNA ライブラリーからアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせて 1 本鎖 g DNA ライブラリー・チップ (レプリカ・チップ) を、残りの枚数 (T 3 ~ T 1 0) 作製することができた。

すなわち、図 6 に示す (b) → (d) → (b) → (d) → . . . の工程を繰り返すことにより、チップ上に同一の 1 本鎖 g DNA ライブラリーを固定化したチップ (図 6 (c) で示す) を何枚でも複製できる。

【0 0 6 9】

【発明の効果】

本発明の装置を用いれば、発現している mRNA からの c DNA ライブラリー及び染色体 DNA の制限酵素処理された g DNA ライブラリーに対する固定化 DNA チップの作製が容易なだけでなく、従来の溶液状態での DNA ライブラリーでは作製することが不可能であったそれらのレプリカが固定化 DNA チップとして必要枚数だけ (原則的には、mRNA 及び g DNA が化学的・物理的に分解されない限り無制限に作製可能)、簡単にしかも短時間に作製できる。

【0 0 7 0】

また、1 回の培養細胞からの少量の遺伝子試料の採取或いは貴重な検体組織からの一度の遺伝子試料の採取によって、固定化 DNA ライブラリー・チップ及びその何枚ものレプリカ・チップが作製でき、同一試料による何種類もの遺伝子研究や遺伝子検査が容易に行なえるようになってくるという計り知れない利益が生

じてくる。

【0071】

さらに、固定化DNAライブラリー・チップ及びそのレプリカ・チップの利用によって、将来の遺伝子診断技術の開発における経費的な節減や大幅な省力化での飛躍的な発展が期待される。

【0072】

また、遺伝子診断に供する患者からの一度の血液採取や組織摘出手術で半永久的な複数の固定化DNAライブラリー・チップが作製できることにより、予防医学的な検査等に対するその再利用も簡単に行なえるようになる。このことは、患者本人に対する精神的及び経済的な苦痛を最小限にとどめるという非常に大きな利益になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のcDNAライブラリー・チップの作製装置の概略図である。

【図2】

本発明のgDNAライブラリー・チップの作製装置の概略図である。

【図3】

本発明のcDNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。

【図4】

本発明のcDNAライブラリー・チップの作製手順を示す概略図である。

【図5】

本発明のgDNAライブラリー・チップ作製の手順を示すフローチャートである。

【図6】

本発明のgDNAライブラリー・チップの作製手順を示す概略図である。

【図7】

チップfの拡大図である。

【図8】



チップ e の拡大図である。

【符号の説明】

A, B . . . DNAライブラリー・チップ作製装置

1 0 . . . チップの入った容器を保持するための容器保持手段

2 0 . . . 試薬容器保持手段

3 0 . . . 容器中の反応液を加熱冷却する容器液温度制御手段

4 0 . . . 試薬容器温度制御手段

1 0 0 . . . ノズル駆動手段

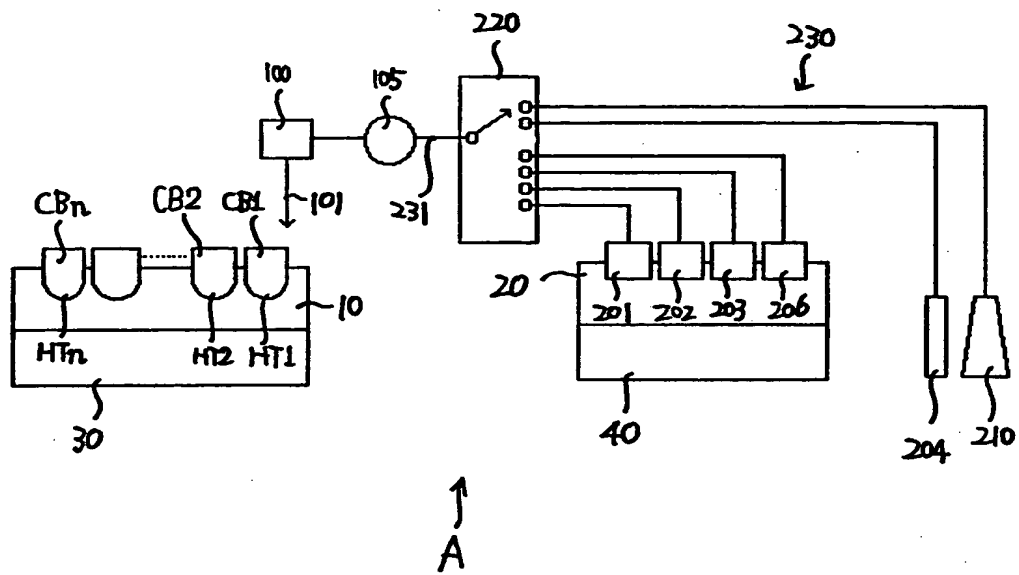
1 0 1 . . . 試料注入注出用ノズル

1 0 5 . . . 応液等を容器に送液するための送液手段

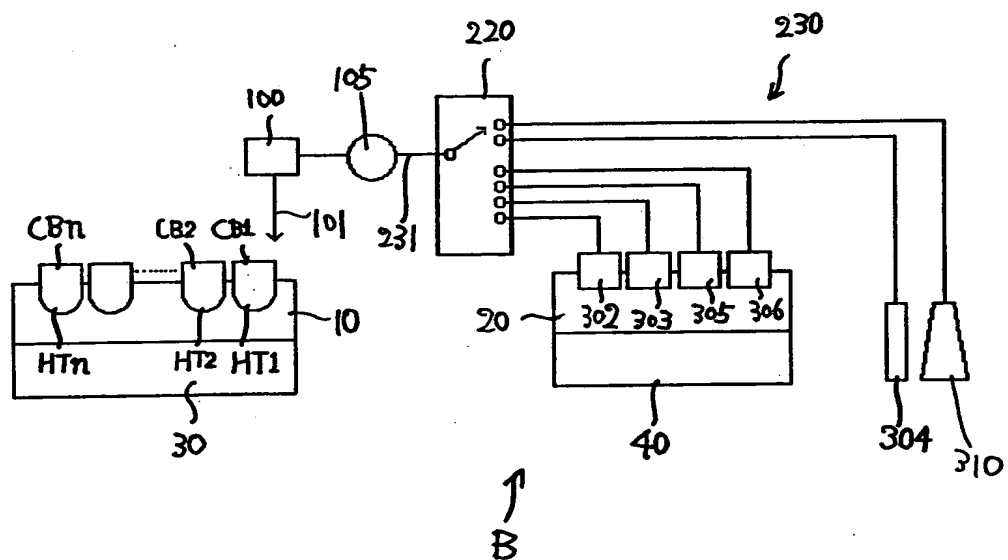
2 2 0 . . . 反応液を切り替えて送液するための送液切替手段

【書類名】 図面

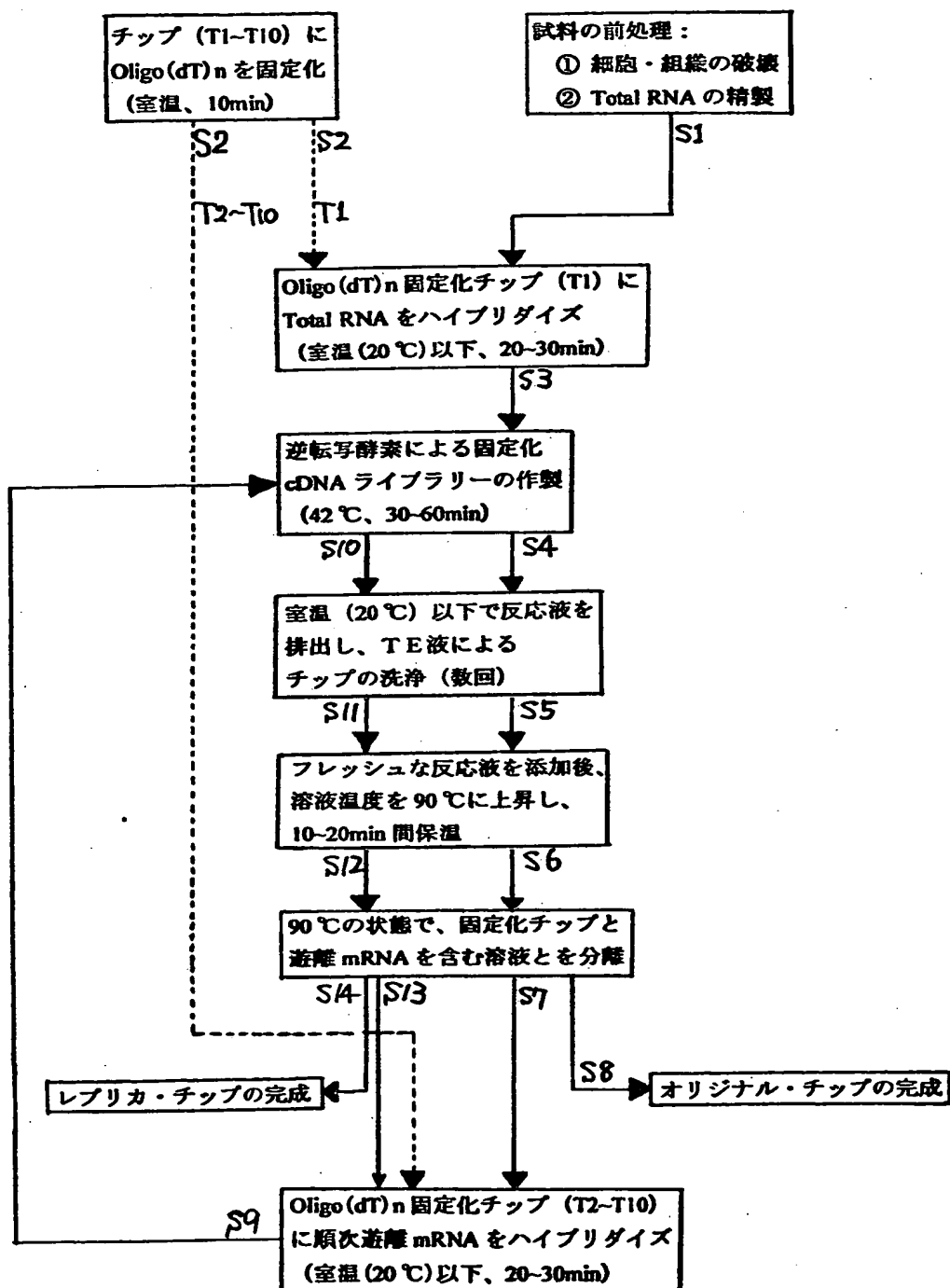
【図 1】



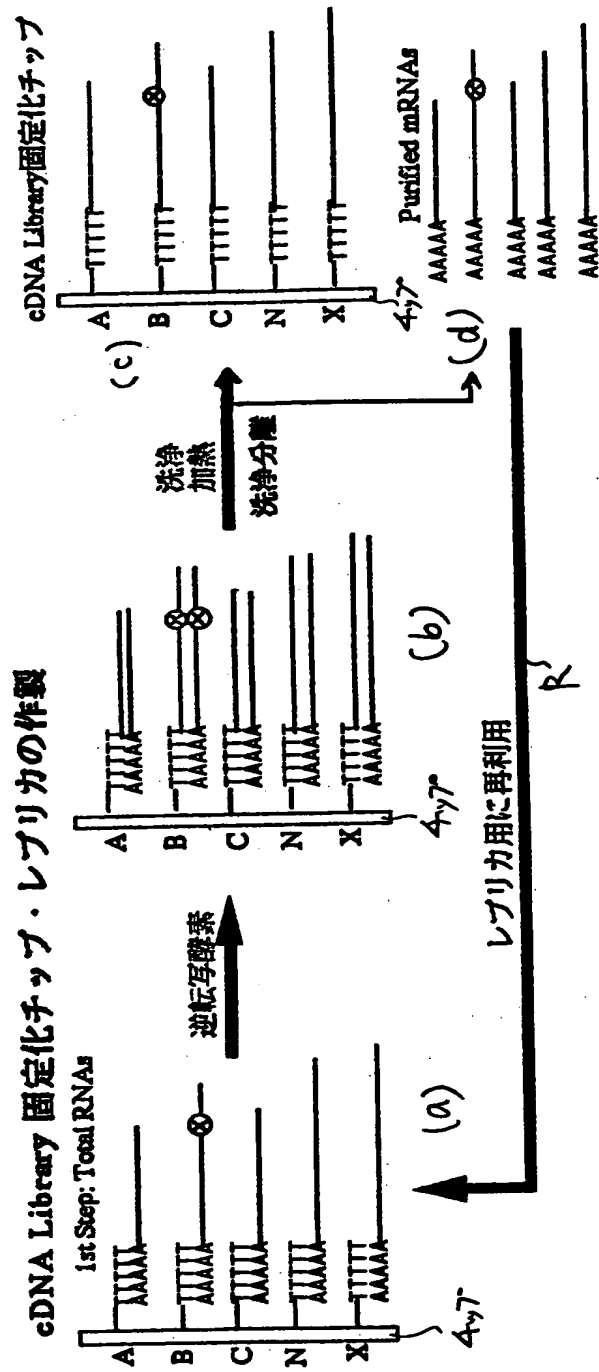
【図 2】



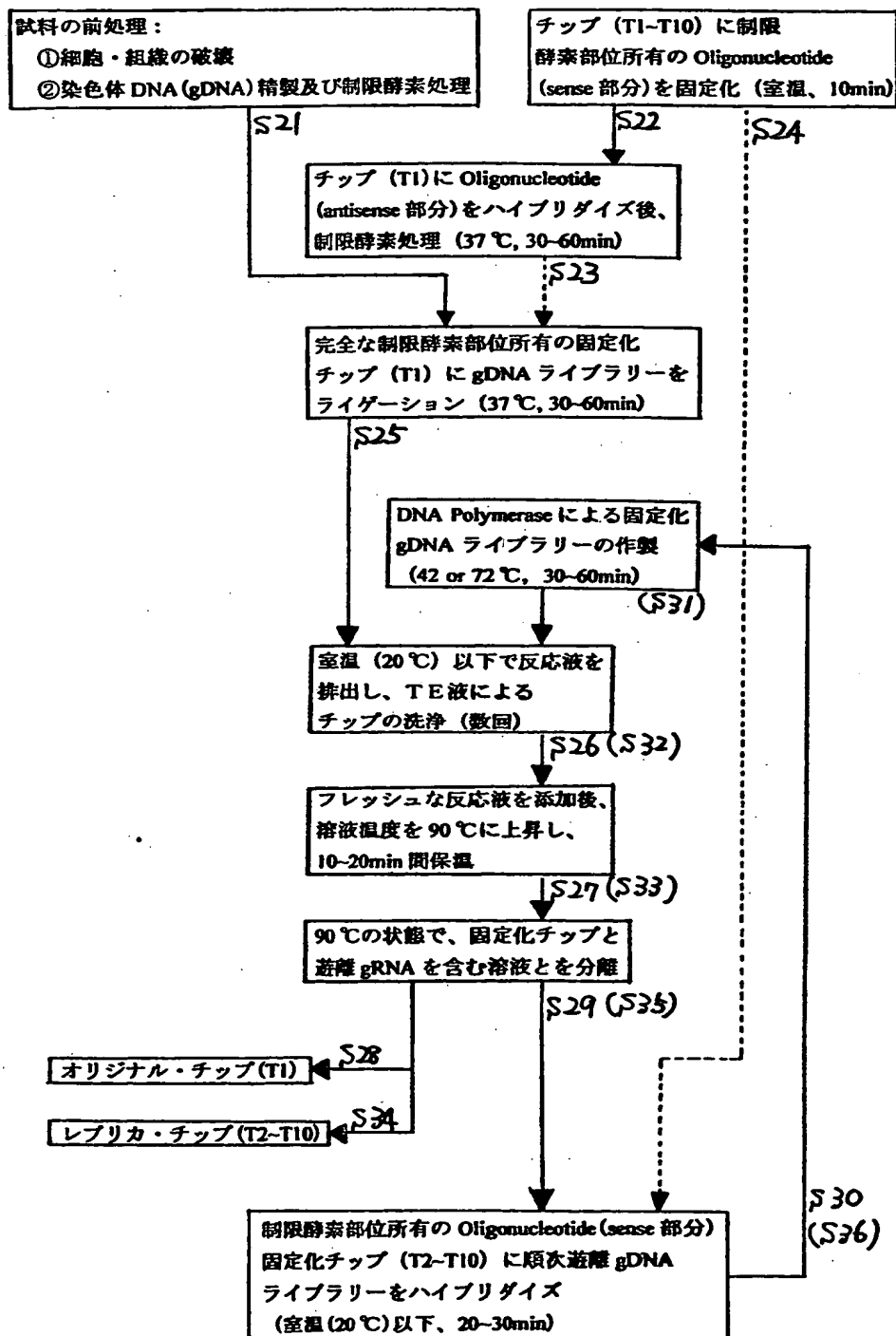
【図 3】



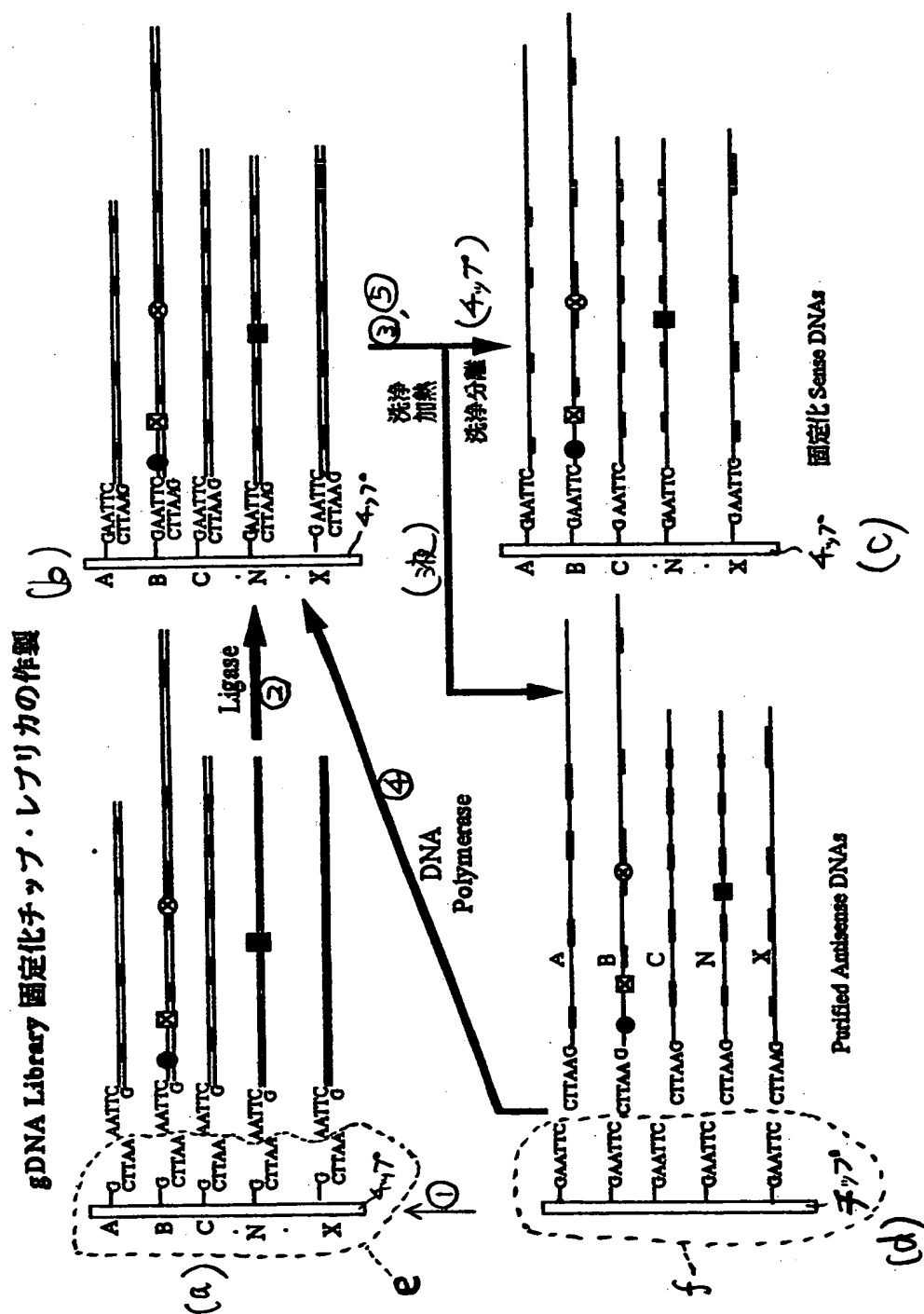
【図 4】



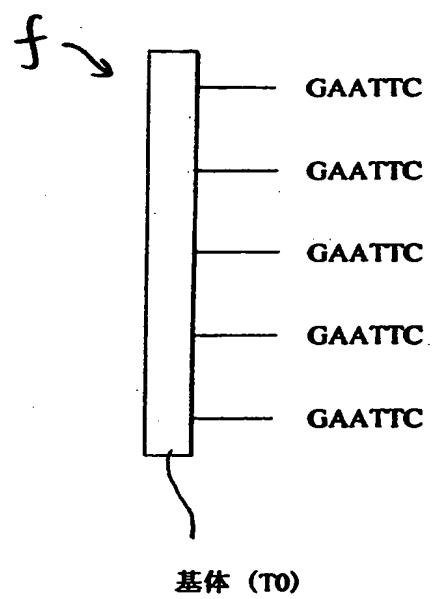
【図 5】



【図 6】

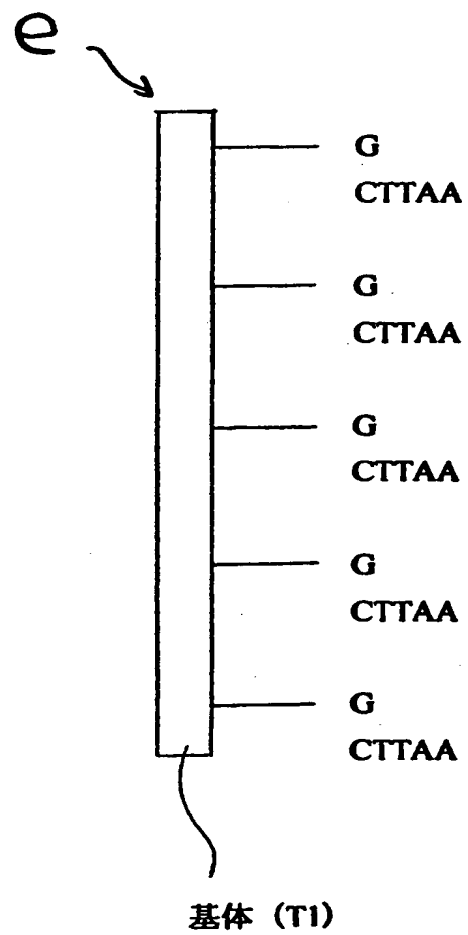


【図 7】





【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子工学、蛋白質工学、細胞工学、免疫学等の分子生物学や生化学関連分野において、微量のDNA試料を用いて、DNAライブラリー等を基体上に固定化したオリジナル・チップを作製する方法、その複製を作製する方法、複製したDNA断片を固定化した基体を提供する。

【解決手段】 cDNAライブラリー作製方法は、mRNAをハイブリダイズさせた後、逆転写酵素を作用させて、基体上に相補的なDNAを固定化させる。あるいは、基体上に固定化したcDNAライブラリーからmRNAを脱ハイブリダイズさせ、そのmRNAを用いて、前記cDNAライブラリーと同一のcDNAライブラリーを固定化させる。

gDNAライブラリー作製方法は、二本鎖の染色体DNAライブラリーをライゲーションさせた後、基体上にgDNAライブラリーを固定化させる。あるいは、二本鎖の染色体DNAライブラリーをライゲーションさせた後、基体上にgDNAライブラリーのセンス部分を固定化させる。また、gDNAライブラリーのアンチセンス部分を脱ハイブリダイズさせた後、そのアンチセンス部分を基体上に固定化させる。

【選択図】 図3

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第127943号
受付番号	59900433514
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 5月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 5月10日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390003193]

1. 変更年月日 1990年10月11日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都千代田区霞が関1丁目4番3号  
氏 名 東洋鋼鋳株式会社
2. 変更年月日 2000年 3月27日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都千代田区四番町2番地12  
氏 名 東洋鋼鋳株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591091135]

1. 変更年月日 1991年 4月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 広島県広島市南区出島1丁目34番26号  
氏 名 株式会社日本パーカーライジング広島工場

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598025382]

1. 変更年月日	1998年 2月10日
[変更理由]	新規登録
住 所	広島県広島市南区宇品御幸1丁目9番26号
氏 名	高橋 浩二郎